

サルモネラにおける抗原の人工變換 (V)

E₂ 群 O 抗原特異多糖類の化學的分析*

中 川 武 彌

札幌医科大学微生物學教室 (主任 植竹教授)

Changes Induced in the Antigens of Salmonella (V)

Chemical Analysis of Antigenic Polysaccharide of Salmonella E₂ Group

By

TAKEYA NAKAGAWA

Department of Microbiology, Sapporo University of Medicine

(Chief: Prof. H. UETAKE)

サルモネラ E 群の O 抗原については、ある菌株では E₁ 群の O 抗原から E₂ 群の O 抗原に (S. anatum, S. meleagridis¹⁾) また E₂ 群の O 抗原から E₁ 群の O 抗原に (S. newington, S. newbrunswick²⁾) 變換を起すことが出来ることが報ぜられた。この變換は復元も可能である³⁾。またこの變換の機轉についても前報で報じた⁴⁾。

肺炎双球菌の莢膜多糖体についてはその若干のものについては化學的分析が行われ、その構成糖類も明かにされており、構成糖類の差によつて血清學的差異が規定されていることが知られてきている⁵⁾。ひるがえつてサルモネラについてみるとどうであろうか。その O 抗原の特異性を規定しているものが多糖体であることはかなり以前から知られているが⁶⁾、その多糖体の構造についてはまだ殆ど知られていない^{7)~10)}。われわれの研究室ではこの点に着目し、サルモネラ各群の菌にいつ

てその O 抗原特異多糖体單糖構成をしらべ、抗原の特異性の解明に努力している¹¹⁾。

そこで一つには抗原の人工變換に伴う特異多糖体の單糖構成の變化を検索するため、一つにはサルモネラ各群の菌の抗原多糖体分析の一連の研究の一部として E₁ 群、E₂ 群の菌株の O 抗原の特異多糖体の單糖構成を検索した。ここには E₂ 群 S. newington C₂ の O 抗原についての實驗成績を報告する。E₁ 群の O 抗原については佐々木と協同で發表の予定である。

實驗材料及び實驗方法

菌株： 菌株はサルモネラ委員會 (現在の腸内細菌委員會) より分與された、サルモネラ E₂ 群 S. newington C₂ 株を用いた。

實驗方法

1) 抗原性特異多糖体抽出過程

* この研究は文部省科学研究費の補助を受けた (植竹)。この研究の要旨は第 25 回日本細菌学会 (昭和 27 年 4 月 7 日) で發表した。

1) Bruner & Edwards: J. Bact. 55, 449 (1948).

2) 小原: 札幌医紀要 1, 68 (1950).

3) 中川: 札幌医誌 4, 318 (1954).

4) 中川: 札幌医誌 4, 386 (1954).

5) Burger, M.: Bacterial Polysaccharides—Their Chemical and Immunological Aspects— (1950).

6) Mikulaszek, E.: Ergeb. Hyg. usw. 17, 415 (1935).

7) 黒屋・森川・木村: 綜合医学 9, (13), 35 (1952).

8) Freeman, G. G., Challinor, S. W. & Wilson, J.: Biochem. J. 34, 307 (1940).

9) Freeman, G. G. & Anderson, T. H.: Biochem. J. 35, 564 (1941).

10) Freeman, G. G.: Biochem. J. 37, 601 (1943).

11) 植竹等: 細菌学雑誌 7, 415 (1952); 細菌学雑誌 8, 518 (1953).

Roux 瓶を用いて普通寒天培地を作り、これに *S. newington* C₂ 株を移植して 37° 48 時間培養する。

培養した菌は少量の生理的食塩水を加えて洗い出し、それを綿花で 2 回濾過を加えてから De Lavale 遠心分離器にかけて菌体を湿量で 109 g をえた。これについて alcohol 1, ether 3 の割の混合液によつて菌体の脱脂洗滌を 3 日毎に 1 回、上清が清澄になるまで 3~4 回繰返した。

次に菌体を 1 cc 当り 200 mg の割に蒸留水に浮遊させ、1 時間振盪機にかけてから、等量の N/2 三塩化醋酸を加えて氷室に時間放置し、次で遠心沈澱をかけて沈渣を除去する。上清を流水で透析し、3 倍量の acetone を加えて

Boivin 抗原¹²⁾を得た。これは乾燥量で 30.7 mg であつた。

上述の操作を同様に湿量 52.5 g の *S. newington* C₂ 株について行い乾燥量で 15.25 mg の Boivin 抗原を得たのでこれらを合せて以下芦田氏変法¹³⁾に従つて抗原特異多糖体を抽出した。

即ち Boivin 抗原を alkali で処理して alkali 処理 Boivin 抗原を得、これを弱酸 (N/10 CH₃ COOH) で部分加水分解を行い Soxhlet 抽出器で 48 時間連続脱脂抽出を行い、ether 可溶部分を除き、更に peptide 部分を遠心分離除去する。この上清について alcohol 分割沈澱を繰返すことによつて精製 polysaccharide 20 mg を得た。この分離過程を括めたものが (Fig. 1) である。

2) 沈降反応

Boivin 抗原及び、これを更に精製処理して得た多糖体抗原については沈降反応によつて血清学的に抗原性を確かめた。血清は *S. newington* O 血清で行つた。

3) paper chromatography

Boivin 抗原及び精製特異多糖体について paper chromatography により、その単糖構成をしらべた。即ち Boivin 抗原及び精製特異多糖体の 15 mg を N-硫酸によつて還元力最大を示すところまで (約 6 時間) 加水分解し、Ba (OH)₂ で中和して、その濾液を遠心分離して上清を減圧濃縮し以下の如き條件で分析を行つた。

展開: 25°C, 一次元上昇法 (3 種展開剤について) 展開時間 24 時間。

展開剤^{14), 15)}:

- (1) phenol/H₂O (4:1, V/V)
- (2) n-butanol/acetic acid/H₂O (9:1:7, V/V 上清)
- (3) ethylacetate/acetic acid/H₂O (3:1:3, V/V)

乾燥: 通気 draft による。

発色: anilin hydrogen phthalate¹⁶⁾ を噴霧してから 110° の乾熱滅菌器中に 5~10 分放置してしらべた。

同定: 展開に当つては常に 10 種の

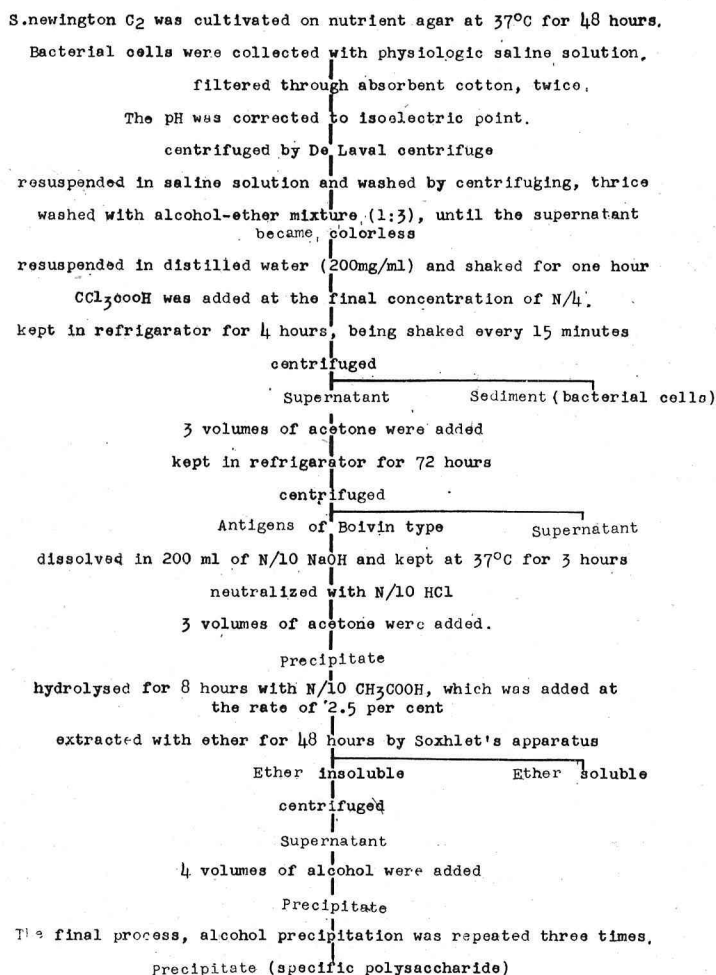


Fig. 1. Process for Preparing Specific Polysaccharide of *S. newington*.

12) Boivin, A. Mesrobianu, I. et Mesrobianu, L.: C. R. Soc. Biol. 113, 490 (1933); Ibid., 114, 307 (1933).
13) 芦田: 綜合医学, 28, 417 (1944).

14) Partridge, S. M.: Biochem. J. 42, 238 (1948).
15) Partridge, S. M.: Ibid. 42, 251 (1948).
16) Partridge, S. M.: Nature 164, 443 (1949).

單糖体を対照として同一紙上で展開分離し、それ等と比較しつつ同定した。

hexosamine 及び n-acetyl hexosamine については Elson & Morgan の方法¹⁷⁾、紫外線によつて濾紙上の螢光を見る方法¹⁸⁾、Ninhydrin 反應によつた。uron 酸の同定は Naphtho-resorcinol 反應によつた¹⁹⁾。

実験成績

沈降反應： Boivin 抗原，特異多糖体各 5 mg をとつて生理的食塩水にとかし 10^8 ，倍稀釋まで作り S. newington O 血清について沈降反應を行つた。特異多糖体は S. newington O 血清原液とは 1×10^7 抗原稀釋まで沈降反應陽性を示した (Table 1)。

Table 1. Precipitin Reaction Between S. newington Specific Polysaccharide and S. newington O immune serum

Antigen dil Serum dil	1 : 10^4	1 : 3×10^4	1 : 10^5	1 : 3×10^5	1 : 10^6	1 : 3×10^6	1 : 10^7	1 : 3×10^7	1 : 10^8
1 : 1	+	+	+	+	+	+	+	—	—
1 : 2	+	+	+	—	—	—	—	—	—
1 : 4	—	—	—	—	—	—	—	—	—

paper chromatography: Paper chromatography を用いて Boivin 抗原及び精製抗原性特異多糖体について一次元上昇法 (対照をおいて) を 3 種の展開剤について行つた結果をえた。

即ち何れの展開剤を用いても mannose, galactose, glucose, rhamnose, glucosamine, n-acetyl glucosamine, 移動の遅い未知一炭水化物, hexuron 酸が分析された。

glucosamine, n-acetyl glucosamine が確認せられたがこれらは多糖体中に両者共に存在するものか、それとも

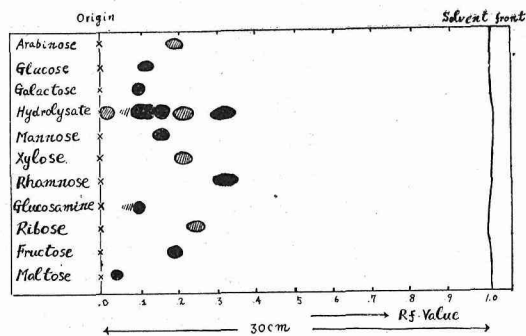
後者のみで前者は二次的に生成せられたかはこれまでのところ不明である。

以上検出された糖が butanol 系溶媒においてとる配置を示したのが (Fig. 2) である (他の溶媒を用いた場合も同様の一致した成績を示した 圖略)。

考 按

サルモネラ E 群ではその群の間に抗原の変換が行われることが知られてきたが、変換の行われる群の間は明かに血清学的に区別されているので、その各特異抗原の構成糖類に差があるかどうかをしらべた。

著者は先に復元実験で小原の得た 84 B 株 (III, X, XXVI) を母株である S. newington C₂ に復元させ、また変換の機轉についての実験では S. newington から S. anatum に人工的に変換出来ることを示した。それで S. newington 株について構成糖類を分析し E₁ 群及び E₃ 群の構成糖類と比較せんとしたのである。paper chromatography を用いて mannose, galactose, glucose, rhamnose, glucosamine, n-acetyl glucosamine 移動の遅い未知一炭水化物 hexuron 酸を検出した。これらの糖のうち就中 galactose については、大量の菌を集める場合普通寒天培地を用いるので寒



Solvent: n-C₄H₉OH/CH₃·COOH/H₂O
(9:1:7, v/v), 24 hrs., 25°C.

Notes: ● Red-brown color (Aldopentoses),
● Olive-brown color (Other sugars),
■ Tailing spots.

Fig. 2. Paper chromatogram of monosaccharide constituents of purified antigenic polysaccharide extracted from S. newington C₂

17) Elson, L. A. & Morgan, W. T.: Biochem. J. 27, 1824 (1933).

18) 植竹・他: 細菌学雑誌 7 (特) (1952); 8 (特) (1953).

19) Partridge, S. M.: Biochem. J., 42, 238 (1948).

天成分に由来するのではないかという疑いが入るかも知れない。これについては佐々木及び著者が別報に報ずるとおり「Boivin 抗原までのところでも寒天に由来する galactose は殆ど考慮に入れる必要がない程である。従つてさらに芦田氏法によつて処理した特異多糖体においては寒天に由来する galactose の影響は全くない」と考えられる。

S. newington C₂ 株より以上の如く単糖を検出したので、これについて佐々木・著者²⁰⁾ 或は佐々木・伊勢²¹⁾ の報する E₁, E₃ 群と比較してみるに、E₁ 群の S. anatum E₃ 群の S. senftenberg 何れからも全く同一の単糖が検出されている。

それ故サルモネラ E 群においては定性的には構成糖類には差が認められないので、差ありとせば量的かまたは立体構造上の差によるのではないかと考えられる。伊勢²¹⁾ の実験によると S. senftenberg から誘導さる血清学的に III しか有しないと思われる菌株の構成単糖体をしらべた結果では rhamnose が痕跡的にしか認められないという点で、S. anatum, S. newington, S. senftenberg の特異多糖体の構成単糖と異なっている。

著者の場合抗原変異株株 (84 E 株, 84 F 株) の特異抗原多糖体の分析は行わなかつたが、佐々木と協同研究で S. anatum (84 E 株, 84 F 株と同じ抗原構造) の特異多糖体の分析を行つたところでは前述のように S. newington と同一の単糖が証明されているから、抗原変異株の特異多糖体の単糖構成も同一と推量して誤ちなかろうと思われる。

結 論

S. newington C₂ 株の O 抗原の特異性を規定している特異多糖体を抽出し paper chromatography で分析した結果 mannose, galactose, glucose, rhamnose glucosamine, n-acetyl glucosamine, 移動の遅い未知—炭水化物 hexuron 酸を検出した。これらの糖を E₁ 群の S. anatum E₃ 群の S. senftenberg と比較すると定性的には差は認められなかつた。このことはサルモネラ E₁, E₂, E₃ 各群の O 抗原の血清学的特異性を規定するものは構成糖類の量的差異若くは立体構造上の差異であることを暗示する。

(昭和 29. 2. 10 受付)

Summary

A Boivin type of antigens was prepared from agar cultures of S. newington C₂ and from these antigens specific antigenic polysaccharide was extracted. Monosaccharide composition of the specific polysaccharide was analysed by paper partition chromatography, which revealed the presence of the following substances: mannose, galactose, glucose, rhamnose, glucosamine, N-acetylglucosamine, a hexuronic acid and an unknown carbohydrate which moves very slowly. Qualitatively these components are the same as those of specific polysaccharide of S. anatum in E₁ group of Salmonella or those of S. senftenberg in E₃ group of Salmonella.

These facts suggest that the serological specificity of respective O antigens of E₁, E₂ or E₃ group of Salmonella depends upon quantitative differences of these constituent monosaccharides or upon differences of spacial arrangement of these components in specific polysaccharide.

(Received Feb. 10, 1954)

20) 佐々木・中川：未刊；植竹・他：細菌学雑誌 7, (特) (1952).

21) 佐々木・伊勢：未刊；植竹・他：細菌学雑誌 7, (特) (1952).

22) 伊勢：札幌医誌 5, 101 (1954).